

**Untersuchungen über
ein Verfahren zur COHb-Bestimmung
mit Hilfe von
Zephirol- und Riseptinlösungen**

Arnold L. Kendall

Druck: Anneliese Schubert, München 5, Corneliusstraße 21, Telefon 21777



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DEM GERICHTLICH - MEDIZINISCHEN INSTITUT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. W. LAVES

UNTERSUCHUNGEN
ÜBER EIN VERFAHREN ZUR COHb-BESTIMMUNG
MIT HILFE
VON ZEPHIROL- UND RISEPTINLÖSUNGEN

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Arnold L. Kendall

aus

Pasadena, Californien (USA)



München 1959

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. W. L A V E S

Dekan: Professor Dr. W. K O L L E

Tag der mündlichen Prüfung: 12. 2. 1959

DEDICATED
TO ALL WHO WERE SINCERELY
INTERESTED IN MY LONG STUDIES

UNTERSUCHUNGEN ÜBER EIN VERFAHREN ZUR COHb-BESTIMMUNG MIT HILFE VON ZEPHIROL- UND RISEPTINLÖSUNGEN

E I N L E I T U N G

Unter den Vergiftungen, besonders den in suicidalen Absicht erfolgten, spielt die CO-Vergiftung eine große Rolle. Sie kann sowohl durch ausströmendes Kochgas als auch durch die Auspuffgase aus Verbrennungsmotoren oder Rauchabzugsgase verursacht werden. Besonderes Interesse beanspruchen jene Fälle, in denen es zu tödlichen Vergiftungserscheinungen kommen kann, wenn nämlich die Atmosphäre durch ungenügenden Zutritt von Sauerstoff zur Kochgasflamme kontinuierlich von kleineren Mengen CO angereichert wird. Vielfach ist die Tatortsituation beim Auffinden von Leichen in geschlossenen Räumen (auch Garagen) völlig unklar und erst die Obduktion liefert Anhaltspunkte, die für das Vorliegen einer CO-Vergiftung sprechen. Bekannt ist die hellrote Farbe der Totenflecke, die bereits bei der äußeren Besichtigung einer Leiche auffällt, ferner das flüssige hellrote Leichenblut, eine verhältnismäßige Blutarmut der Milz sowie die hellrote Verfärbung der Muskulatur. Alle diese Veränderungen sind aber nicht spezifisch für eine CO-Vergiftung, sondern können auch auf anderen Ursachen beruhen. Erwähnt sei lediglich, daß die ebenfalls hellroten Totenflecke bei Reoxydation des peripheren Kapillarblutes, eine Erscheinung, die hauptsächlich bei kalter Außentemperatur zu beobachten ist, zu Täuschungen Anlaß geben kann. Flüssiges Leichenblut findet man ferner auch bei anderen Erstickungsodesarten. Da sowohl der Arzt als auch die Ermittlungsbehörde an der raschen Aufklärung unklarer Todesfälle interessiert sind, kommt den Nachweisreaktionen von Kohlenoxyd eine große Bedeutung zu.

Man unterscheidet einfach durchzuführende qualitative und empfindliche quantitative Methoden. Während erstere noch im Laufe der Ob-

duktion angestellt werden können und begründete Anhaltspunkte für das Vorliegen einer CO-Vergiftung liefern - zumindest dann, wenn ein größerer Teil des Oxyhämoglobins in CO-Hämoglobin umgewandelt ist - nehmen die quantitativen Untersuchungen mehr Zeit in Anspruch und sind an ein entsprechend apparativ ausgestattetes Laboratorium gebunden. Im Rahmen der gestellten Aufgabe erscheint es angebracht, zunächst die gebräuchlichsten Nachweismethoden kurz anzuführen.

a) Qualitative Methoden:

Unter den Verfahren zum qualitativen Nachweis sind die chemischen Reaktionen zu erwähnen, die darauf beruhen, daß die hellrote Farbe des schwer zerstörbaren CO-Hämoglobins bei Zusatz geeigneter Chemikalien sich länger hält, als die hellrote Farbe des HbO_2 . Diese Proben sind allerdings nur bis zu einem Gehalt von ca. 25% CO-Hämoglobin verlässlich. (1)

Je niedriger die Werte liegen, umso größer werden die Unsicherheitsfaktoren. Ganz allgemein gilt, daß die nachstehend genannten Verfahren lediglich als sog. Vorproben angesprochen werden können.

1.) Probe nach HOPPE-SEYLER (2):

Einige Tropfen CO-Blut werden in einer weißen Schale mit der gleichen Menge 30%iger KOH gemischt. Es bildet sich ein hellrotes Gerinnsel, beim Einbringen in Wasser resultiert eine rote Farbe. CO-freies Blut verursacht braune Gerinnsel und eine grünliche Verfärbung der Lösung.

2.) Probe nach KUNKEL (3):

In Reagensgläsern wird CO-Blut und eine Vergleichsblutprobe nach Verdünnen mit Wasser mit der 3-fachen Menge einer 3%igen Tanninlösung versetzt. Im ersteren Falle bleibt die hellrote bis dunkelrote Farbe bestehen, im letzteren wird sie graubraun.

3.) Formalinprobe:

CO-Blut und Kontrollblut wird in Reagensgläsern mit der gleichen Menge 40%igem Formalins versetzt und kräftig durchgeschüttelt. Es entsteht eine starre Masse, die beim CO-Blut dunkelrot, bei CO-freiem Blut graubraun ist.

Ferner verdienen noch angeführt zu werden, die Pyrogallolprobe (4) die Methode nach WACHHOLZ-SIERADSKY (5) und die Dreigläserprobe von SCHWARZACHER (6).

4.) Spektroskopische Untersuchung :

Der spektroskopische Nachweis von CO-Hämoglobin beruht auf der verschiedenen Lage der Absorptionsbanden des CO-Hämoglobins und O_2 -Hämoglobins besonders im grünen Teil des Spektrums.

Weitere Unterschiede ergeben sich nach Zusatz von Reduktionsmitteln. Während die Spektren der beiden Blutfarbstoffarten sonst annähernd gleich, beim COHb nur etwas gegen das violette Ende verschoben sind, ist nach Reduktion ein deutlicher Unterschied wahrzunehmen. Vor Zusatz des Reduktionsmittels zeigen beide Blutlösungen zwei Verdunklungsstreifen: einen dichteren und schmäleren an der D-Linie, also im gelben Anteil des Spektrums, und einen zweiten breiteren, etwas verwascheneren zwischen den Linien D u. E im gelbgrünen Anteil des Spektrums. Nach Zusatz des Reduktionsmittels verschwinden die beiden Streifen in der HBO_2 -Lösung und an ihre Stelle tritt eine breite Verschattung, das Spektrum des reduzierten Hämoglobins. In der COHb-Lösung bleiben die Streifen bestehen, da COHb nicht reduziert wird.

b) Quantitative Methoden :

Unter den quantitativen Nachweisverfahren besitzt wohl die spektrophotometrische Methode die größte Bedeutung. Sie beruht im Prinzip darauf, daß gleichzeitig mit der Messung des Maximums der Verschattung auch eine Messung des Minimums zwischen den beiden Streifen erfolgt. Der Quotient der gemessenen beiden Zahlen gestattet anhand einer empirisch gefundenen Tabelle die Ableitung des CO-Hämoglobinwertes. (7, 8).

Auf die gasanalytischen Methoden zum CO-Nachweis wird nicht näher eingegangen. Hervorzuheben ist lediglich die Empfindlichkeit der gasanalytischen Verfahren, die noch Bruchteile von 1% CO-Hämoglobin zu bestimmen gestatten (9, 10, 11).

Außer auf optischem und gasanalytischem Wege kann das CO auch auf chemischem Wege bestimmt werden, und zwar sowohl titrimetrisch (12) als auch gravimetrisch (13). Im letzteren Falle wird das Palladium zur Wägung gebracht, das bei der Reduktion durch CO aus einer Lösung von Palladiumchlorür entsteht. Man kann auf diese Weise noch 0.005% CO erkennen. Nach dem Prinzip der Pd-Cl₂-Reduktion durch CO haben GETTLER und FREIMUTH (14) eine Testfleckenmethode entwickelt, die dann von SEIFERT und SCHMIEDER (15) weiter ausgearbeitet wurde. Man saugt einen Luftstrom durch eine Palladiumchlorürlösung, in der störendes CO der Außenluft gebunden wird. Dann streicht die Luft durch das zu untersuchende Blut, aus dem das CO-Gas unter Wirkung von K-ferricyanid und Milchsäure freigemacht wird. Die nunmehr CO-haltige Luft durchperlt dann eine Lösung von Bleiacetat, wo evtl. aus dem Blut stammendes bezw. durch die Außenluft hereingebrachtes H₂S zurückgehalten wird. Endlich passiert die Luft ein mit Pd-Cl₂ befeuchtetes Testpapier, auf dem sich je nach dem CO-Gehalt des Blutes ein mehr oder minder schwarzer Fleck von metallischem Palladium bildet. Die Intensität des Fleckes ist dem CO-Gehalt des Blutes direkt proportional. Durch Vergleich mit einer Reihe von Standardtestflecken bekannter CO-Mengen kann die CO-Konzentration direkt abgelesen werden.

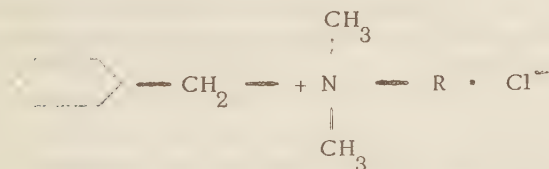
Vorproben und quantitative Untersuchungsmethoden auf das Vorliegen von CO-Hämoglobin sind im vorhergehenden Abschnitt nur kurz gestreift. Auf eine erschöpfende Darstellung, insbesondere auf eine detaillierte Schilderung der Untersuchungstechnik muß verzichtet werden, da diese Ausführungen den Rahmen des Themas überschreiten würden.

H A U P T T E I L

EIGENE VERSUCHE

Die folgenden Untersuchungsreihen gehen auf die Überlegung zurück, daß CO eine um ein Vielfaches größere Affinität zum Hämoglobin besitzt als dies für den Sauerstoff zutrifft. Nach REIN (16) ist die Affinität des CO zum Hämoglobin etwa 300 mal größer als die des O₂, nach BETKE (17) etwa 200 mal. Demzufolge war zu erwarten, daß CO-haltiges Blut nach der Einwirkung von Flüssigkeiten, die das p_H ändern und zu Umwandlungsprodukten des Hämoglobins führen, ein anderes Verhalten zeigt als CO-freies Blut, ein Vorgang, der an sich nicht neu ist, denkt man an die Formalin-Tanninprobe usw. Nach dem Vorschlag von Herrn Prof. LAVES wurden als Verdünnungsflüssigkeiten die Desinfektionsmittel der Firma Bayer "Zephirol" und "Riseptin" gewählt. Es handelt sich dabei um oberflächenaktive Substanzen, die wegen ihrer bakteriziden Eigenschaften als Hautdesinfektionsmittel Verwendung finden.

Zephirol ist eine Verbindung hochmolekularer Alkyldimethylbenzylammoniumchloride der Formel



Riseptin ist eine Verbindung von Dodecyl-dimethyl-3,4-dichlorbenzylammoniumchlorid. Beide wirken alkalisch und haben daher zunächst eine Hämolyse zur Folge. Im Anschluß daran werden sich verschiedene Derivate des Hämoglobins einstellen. Es war nahe liegend, daß durch die Wahl geeigneter Konzentrationen Unterschiede in der Farbe und auch im spektrophotometrischen Verhalten der Blut-Desinfektionsmittelgemische hervorgerufen werden, die für CO-Hämoglobin einerseits und O₂-Hämoglobin andererseits charakteristisch sind.

1.) Untersuchungsmethode:

a) Verdünnungsreihen von Zephirol und Riseptin:

Von den handelsüblichen Zephirol- und Riseptinlösungen wurden Verdünnungsreihen in Reagensgläsern im Verhältnis 1 : 2 bis 1 : 4096 hergestellt. Zu diesem Zweck werden 12 Röhrchen mit 10 ccm aqua dest beschickt, in Röhrchen Nr. 1 kommen außerdem 10 ccm Zephirol- oder Riseptinlösung.⁺⁾ Nach gründlichem Durchmischen des Röhrcheninhalts Nr. 1 werden 10 ccm in Röhrchen Nr. 2 pipettiert, von Röhrchen Nr. 2 in Röhrchen Nr. 3 usw. bis zum Reagensglas Nr. 12. Aus diesem werden schließlich 10 ccm verworfen, so daß alle Gläser 10 ccm eines Wasser-Zephirolgemisches mit sinkendem Zephirolanteil enthalten. Der Ausgangswert bildet eine Zephirolverdünnung im Verhältnis 1 : 2.

b) Herstellung der Blutlösungen:

Vollblut wird im Verhältnis 1 : 3 mit aqua dest. verdünnt. Die Gewinnung von CO-Blut erfolgt derart, daß eine bereits verdünnte Blutlösung 30 Minuten lang mit Kochgas durchperlt wird. Nach dieser Zeit ist die Sicherheit dafür gegeben, daß eine 100%ige Sättigung des Hb mit CO erreicht ist. Es bereitet dann keine Schwierigkeiten mehr, die verschiedenen CO-Konzentrationen durch Mischen von CO-haltigem und CO-freiem Blut zu gewinnen.

c) Ansätze:

In die 12 Reagensgläser, welche fortlaufend die Zephirolverdünnung im Verhältnis 1 : 2 bis 1 : 4096 enthalten, werden je 0,5 ccm 1 : 3 verdünntes CO-freies bzw. CO-haltiges Blut gegeben. Dabei zeigt sich bei Verwendung von CO-freiem Blut in Röhrchen Nr. 4 (Zephirolkonzentration 1 : 16) ein

⁺⁾ Da Zephirol u. Riseptin annähernd die gleichen Ergebnisse zeitigten, wird im folgenden der Einfachheit halben nur Zephirol angeführt, obwohl die Untersuchungsreihen mit beiden Desinfektionsmitteln durchgeführt werden.

Farbton, der jenem der Standardröhrchen im Hämoglobinometer nach Sahli entspricht, der auch nach tagelangem Stehen bei Zimmertemperatur unverändert bleibt. Damit ist auf einfache Weise eine Bezugsgröße gegeben. Bei den Ansätzen wurde also zunächst kontrolliert, ob nach Zugabe der Blutverdünnung zu der im Verhältnis 1 : 16 verdünnten Zephirolösung ein dem standardisiertem Sahli-Wert entsprechender Farbton resultierte. Es wurde daher von einer Zephirolverdünnung 1 : 16 ausgegangen.

d) Auswertung :

Die Verdünnungsreihen werden nach Zufügen des Blutes sowohl makroskopisch beobachtet als auch spektrophotometrisch ausgewertet. Im ersteren Falle ist vor allem auf Farbveränderungen zu achten, die entweder sofort oder erst nach längerem Zuwarten eintreten, im letzteren erfolgt die Messung der Verdünnungsstufen bei den Wellenlängen von 480 bis 620 mμ. Die Meßpunkte wurden in Diagramme eingetragen. Für die Messungen stand das Quarz-Spektrophotometer Unicam zur Verfügung.

2.) Untersuchungsergebnisse :

In orientierenden Vorversuchen wurden bei Zimmertemperatur die vorbereiteten Zephirolverdünnungen von 1 : 16 (Röhrchen Nr. 1) bis 1 : 4096 (Röhrchen Nr. 9) zunächst mit 1 : 3 verdünnten HbO_2 - bzw. COHb-Lösungen verschiedener Konzentration beschickt. Dabei traten Farbveränderungen ein, die für die weitere detaillierte Untersuchung Erfolg versprochen.

a) Makroskopischer Farbenvergleich :

Zunächst wurden 4 Testreihen angesetzt, und zwar mit Lösungen von HbO_2 , ferner mit 50%-, 70%- und 100%igen $\text{Hb-CO}^{+})$.

+) Um Wiederholungen zu vermeiden, wird im folgenden nur von Hb-O_2 bzw. CO-Hb-Lösungen gesprochen, wobei vorausgesetzt wird, daß die Lösungen jeweils im Verhältnis 1 : 3 verdünnt sind.

Die mit der Zephirolverdünnung vorbereiteten Reagensgläser (beginnend mit 1 : 16) wurden mit je 0,5 ccm der Blutlösungen beschickt, der Inhalt kräftig durchmischt. Die Ableseung erfolgte unmittelbar nach Zugabe des Blutes, sowie nach 24 Stunden und nach 48 Stunden. Da die verschiedenen CO-Konzentrationen lediglich einen Unterschied in der Intensität des Farbtones, nicht aber in der Farbenkomposition aufwiesen, erübrigt sich eine gesonderte Beschreibung. Bei der makroskopischen Vergleichung konnten folgende Befunde erhoben werden:

CO-Blut: CO-Hb 50%

Farbe:

Sofortreaktion: Röhrchen	Nr.	1 - 2 :	dunkelrot, klar
"	"	3 - 9 :	hellrot, trüb

Nach 24 Std.:	"	"	1 - 2 :	grünbraun, klar
	"	"	3 - 4 :	hellbraun, trüb
	"	"	5 - 6 :	rot, trüb, Sediment
	"	"	7 - 9 :	rot, klar, Sediment

Nach 48 Std.:	"	"	1 - 2 :	grünbraun, klar
	"	"	3 - 4 :	hellbraun, klar, schw. Sed.
	"	"	5 - 9 :	rot, klar, Sediment

Vergleichsblut: Hb-O₂

Farbe :

Sofortreaktion: Röhrchen	Nr.	1 - 2 :	braun, klar
"	"	3 - 4 :	braunrot, trüb
"	"	5 :	rot, trüb
"	"	6 - 9 :	rot, trüb

Nach 24 Std.:	"	"	1 - 2 :	grünbraun, klar
	"	"	3 - 4 :	hellbraun, trüb
	"	"	5 - 9 :	rot, klar, Sediment

Sofortreaktion: Röhrchen Nr.

Farbe :

Nach 48 Std.:	"	"	1 - 2:	grünbraun, klar
	"	"	3 - 4:	hellbraun, klar, schw.Sed.
			5 - 9:	rot, klar, Sediment

Das Ergebnis regte zu einer weiteren Versuchsreihe an, in der die Farbveränderungen in Abständen von je 15 Minuten beobachtet wurden. Als CO-Hb Konzentration wurde dabei eine 100% gesättigte Lösung von CO-Hb gewählt.

CO-Hb (100% Sättigung) :

Farbe :

Sofortreaktion: Röhrchen Nr.	1 - 2 :	rot, klar
" "	3 - 9:	rot, trüb

Nach 15 Min.:	" "	1 - 2:	rot, klar
	" "	3 - 4:	rot, leicht trüb
	" "	5 - 9:	rot, trüb

Nach 30 Min.:	" "	1 - 2:	rot, klar
	" "	3 - 4:	rot, trüb
	" "	5 - 6:	rot, feine Flockung
	" "	7 - 9:	rot, grobe Flockung Sediment

Nach 45 Min.:	" "	1 - 2:	rotbraun, klar
	" "	3:	rot, trüb
	" "	4:	rot, mässige Flockung
	" "	5 - 9:	rot, starke Flockung Sediment

Sofortreaktion: Röhrchen Nr.

Farbe:

Nach 60 Min.:	"	"	1 - 2:	rotbraun, klar
	"	"	3:	rot, trüb
	"	"	4:	rot, feine Flockung
	"	"	5 - 9:	rot, starke Flockung, Sediment, (6-8 st. Bodensatz)
Nach 75 Min.:	"	"	1 - 2:	braunrot, klar
	"	"	3:	hellbraunrot, trüb
	"	"	4:	rot, verst. Flockung
	"	"	5 - 9:	rot, etwas aufhellend, Flockung, starkes Sediment
Nach 90 Min.:	"	"	1 - 9:	Befund wie oben
Nach 130 Min.:	"	"	1 - 2:	braun, klar
	"	"	3 - 4:	hellbraun, trüb
	"	"	5 - 9:	rot, aufgehellte, klar starkes Sediment
Nach 12 Std.:	"	"	1 - 2:	grünbraun, klar
	"	"	3 - 4:	braun, trüb
	"	"	5 - 9:	hellrot, klar, starkes Sediment, großer Bodensatz
Nach 24 Std.:	"	"	1 - 9:	Befund wie oben
Nach 48 Std.:	"	"	1 - 2:	grünbraun, klar
	"	"	3 - 4:	braun, klar
	"	"	5 - 9:	hellrot, gepacktes Sediment

Hb-O₂ (Vergleichsblut) :

Farbe :

Sofortreaktion; Röhrchen	Nr.	1 - 2 :	braun, klar
"	"	3 - 4 :	braunrot, trüb
"	"	5 - 9 :	rot, trüb
Nach 15 Min.:	"	1 - 2 :	braun, klar
"	"	3 :	braunrot, trüb
"	"	4 :	hellbraunrot, trüb
"	"	5 - 9 :	rot, trüb, feine Flockung
Nach 30 Min.:	"	1 - 2 :	braungrün, klar
"	"	3 - 4 :	hellbraun, trüb
"	"	5 - 9 :	rot, grobe Flockung, Sediment
Nach 45 Min.:	"	1 - 2 :	grünbraun, aufhellend, klar
"	"	3 - 4 :	hellbraun, trüb, leichte Flockung
"	"	5 - 9 :	rot, aufgehellt, Flockung Sediment, (7-8 st.Boden- satz)
Nach 60 Min.:	"	1 - 9 :	Befund wie oben
Nach 75 Min.:	"	1 - 2 :	grünbraun, klar
"	"	3 - 4 :	hellbraun, trüb, massige Flockung
"	"	5 - 9 :	rot, aufgehellt, starkes Sediment, klar
Nach 90 Min.:	"	1 - 9 :	Befund wie oben

Sofortreaktion: Röhrchen Nr.

Farbe :

Nach 130 Min.:	"	"	1 - 2:	grünbraun, klar
	"	"	3 - 4:	hellbraun, trüb, Flockung
	"	"	5 - 9:	rot, aufgehellte, starker Bodensatz, gepackt klar

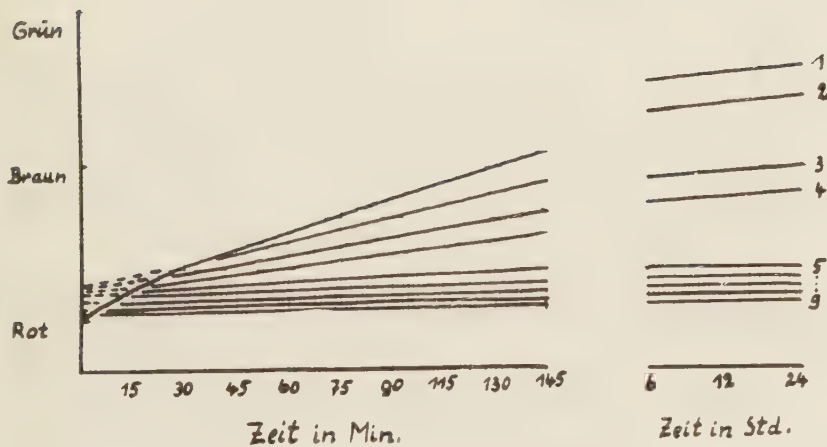
Nach 12 Std.:	"	"	1 - 9:	Befund wie oben
---------------	---	---	--------	-----------------

Nach 24 Std.:	"	"	1 - 2:	grünbraun, klar
	"	"	3 - 4:	braun, trüb
	"	"	5 - 9:	rot, aufgehellte, starker Bodensatz, klar

Nach 48 Std.:	"	"	1 - 2:	grünbraun, klar
	"	"	3 - 4:	braun, klar
	"	"	5 - 9:	hellrot, klar, starkes Sediment

Zur Orientierung über die Veränderungen des Farbtones der Versuchsansätze von CO-Hb- einerseits und HbO₂-Zephirollösungen andererseits mögen folgende Tabellen dienen. Ausgewertet wurden jeweils die Röhrchen Nr. 1 bis 9, entsprechend der Zephirolverdünnungen von 1 : 16 bis 1 : 4096. Die Versuchsansätze wurden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, die Farbveränderungen in Abständen von jeweils 15 Minuten beobachtet und registriert. Aus dem Verlauf der Kurven kann das fehlende Zeitintervall unschwer ergänzt werden.

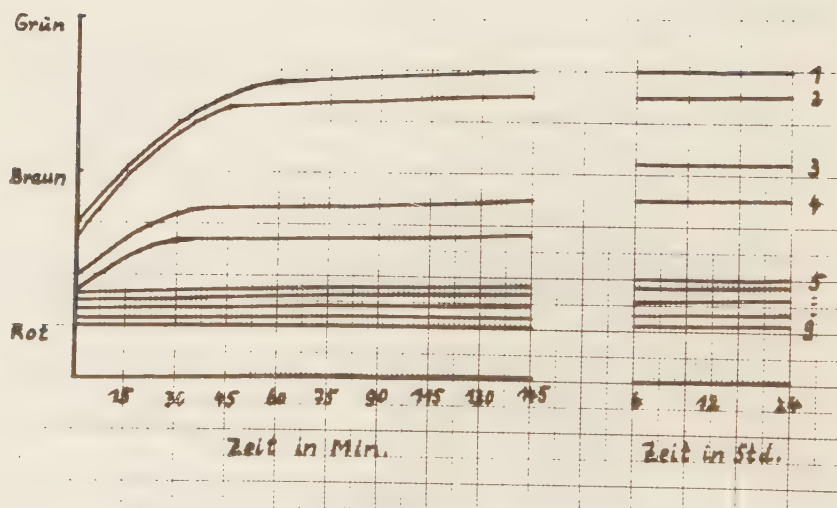
Tabelle 1



Veränderung des Farbtones einer COHb-Zephirollösung in der Zeiteinheit bei Zimmertemperatur. Konstante 100%ige COHb-, wechselnde Zephirolkonzentration.

1:16 (1); 1:32 (2); 1:64 (3); 1:128 (4); 1:256 (5);
1:512 (6); 1:1024 (7); 1:2048 (8); 1:4096 (9).

Tabelle 2



Veränderung des Farbtones einer HbO₂-Zephirollösung in der Zeiteinheit bei Zimmertemperatur. Konstante HbO₂-, wechselnde Zephirolkonzentration (vgl. Tab. 1).

b) Die Zephirolprobe auf Kohlenoxydhämoglobin:

Wie sich aus der übersichtlichen Zusammenstellung der Versuchsreihen und der Tabelle entnehmen läßt, sind die Ansätze von CO-Hb-haltigem Blut, sowie von Normalblut jeweils durch ihre verschiedene Farbe charakterisiert. Eine Rolle spielen einmal der Zeitfaktor, zum anderen die gewählte Zephirol- (Riseptin-) Verdünnung.

Es war zunächst von Interesse, festzustellen, bei welcher Zephirolkonzentration keine Haematinbildung mehr eintritt. Bei Normalbluten war dies bei einer Zephirolverdünnung von 1 : 256 der Fall. Die Ansätze in den Röhrchen Nr. 3 und 4 zeigten eine Mischfarbe (braunrot), ein Umstand, der darauf hinweist, daß der eigentliche Umschlagspunkt bei einer Zephirolverbindung von 1 : 64 bis 1 : 128 liegt. Bei dieser Konzentration macht sich bei Zimmertemperatur bereits in den ersten Minuten eine alkalische Haematinbildung bemerkbar, die bei längerem Stehen der Ansätze fortschreitet, nach 30 Minuten bereits deutlich überwiegt, aber erst nach 24 - stündigem Stehen des Gemisches Hb-O₂-Zephirol voll ausgeprägt ist. Wird zur Hb-O₂-Blutlösung im Reagensglas eine Zephirolverdünnung gegeben, die unter dem kritischen Wert von 1 : 64 zu liegen kommt, so tritt sofort Haematinbildung ein. Die durch konzentriertere Zephirollösungen erfolgende Denaturierung von Haemoglobin zu alkalischem Haematin kann makroskopisch ohne Schwierigkeit an der Braunfärbung der Ansätze erkannt werden.

Anders liegen die Verhältnisse, wenn die Zephirolprobe mit CO-Hb-haltigem Blut durchgeführt wird. Selbst bei konzentrierten Lösungen (Zephirolstammlösung 1 : 2 verdünnt) erfolgt zunächst keine Haematinbildung, sondern das Haemolysat nimmt eine dunkel-kirschrote Farbe an, die bis zu 45 Minuten bestehen bleibt. Erst nach dieser Zeit macht sich ein Farbumschlag im Braunrot bemerkbar, was einer teilweisen Umsetzung von CO-Hb in Haematin entspricht. Während also eine im Verhältnis 1 : 1 bis 1 : 32 verdünnte Zephirolstammlösung in Nor-

mal- (HbO_2) Bluten eine sofortige vollständige Denaturierung in alkalisches Haematin herbeiführt, erfolgt eine nur teilweise Denaturierung in Ansätzen mit CO-Hb-haltigen Bluten erst nach 45 Minuten. Bei stärkeren Zephirolverdünnungen erhält man eine über Stunden farbbeständige Lösung ohne störende Haematinbildung.

Für die Praxis empfiehlt sich folgendes Vorgehen:

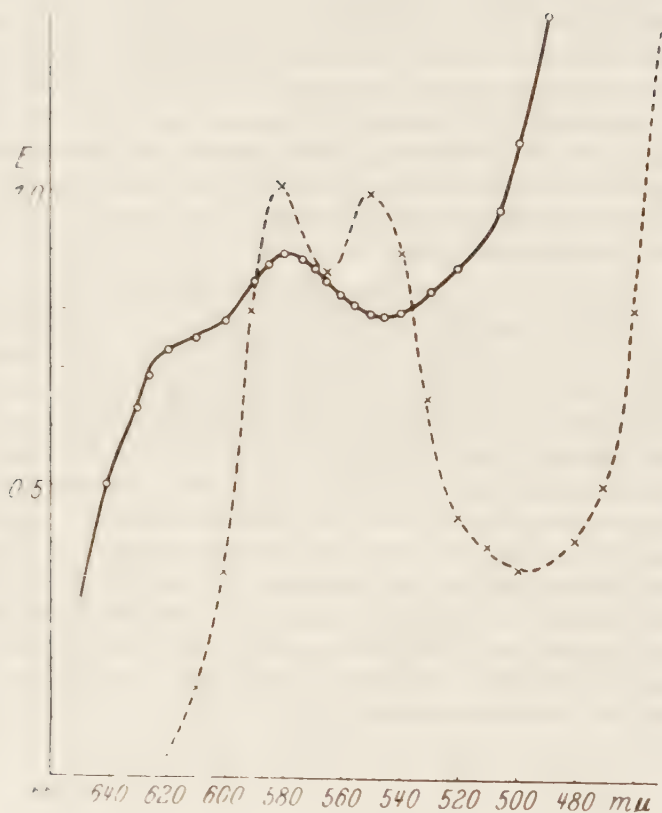
Ein Reagensglas wird mit 0,5 ccm Normalblut und 0,5 ccm 1 : 1 verdünnter Zephirolstammlösung beschickt. Der Ansatz wird mit 10 bis 20 ccm destilliertem Wasser verdünnt. Die Lösung hat dann eine braune Farbe, die bei längerem Stehen in olivgrün übergeht. In ein weiteres Reagensglas werden ebenfalls 0,5 ccm CO-Hb-haltigen Blutes und 0,5 ccm 1 : 1 verdünnte Zephirolstammlösung gegeben. Nach Verdünnen mit 10 bis 20 ccm destilliertem Wasser erhält man eine hellkirschrote, längere Zeit farbbeständige Lösung. Auftretende Trübungen können durch Zentrifugieren entfernt werden.

3.) Spektrophotometrische Auswertung:

Neben dem bereits erwähnten makroskopischen Farbenvergleich der Versuchsansätze, erfolgte auch eine spektrale Auswertung der Blut-Zephirol- bzw. Blut-Riseptinlösungen. Zur Messung der Extinktionen im sichtbaren Teil des Spektrums fand ein Unicam-Quarzspektrophotometer Verwendung. Da nach Zusatz der Zephirolverdünnungen zu den jeweils gleichen Blutmengen eine Trübung bzw. Eiweißflockung eintritt, wurden die Versuchslösungen vor Vornahme der Messung hochtourig zentrifugiert. Geprüft wurde auch das spektrale Verhalten nach Zusatz eines Reduktionsmittels (Natriumdithionit).

In Abbildung 1) ist das Absorptionsspektrum einer Hämoglobinlösung nach Zusatz von Zephirol dargestellt. Wie ersichtlich erhält man alkalisches Hämatin (durchgehende Linie). Nach Reduktion des Ansatzes durch Natriumdithionit tritt das Spektrum des Hämochromogens in Erscheinung. Durch diese Befunde wird bewiesen, daß konzentriertere Zephirollösungen Hämoglobin zu alkalischem Hämatin denaturieren (Abb. 1). Der sowohl makroskopisch sichtbare Farbumschlag als auch die spektrophotometrisch nachweisbare Denaturierung der Blut-Desinfektionsmittelgemische bildet die Voraussetzung für die Anwendung der Methode in der Praxis. Die Wirkung von Zephirol (Riseptin) auf kohlenoxydhämoglobinhaltiges Blut ist in Abb. 2) dargestellt. Der Kurvenverlauf entspricht CO-Hämochromogenen. Durch Zusatz von Dithionit werden die Absorptionsmaxima bei 580 und 550 m μ noch intensiviert (Abb. 2).

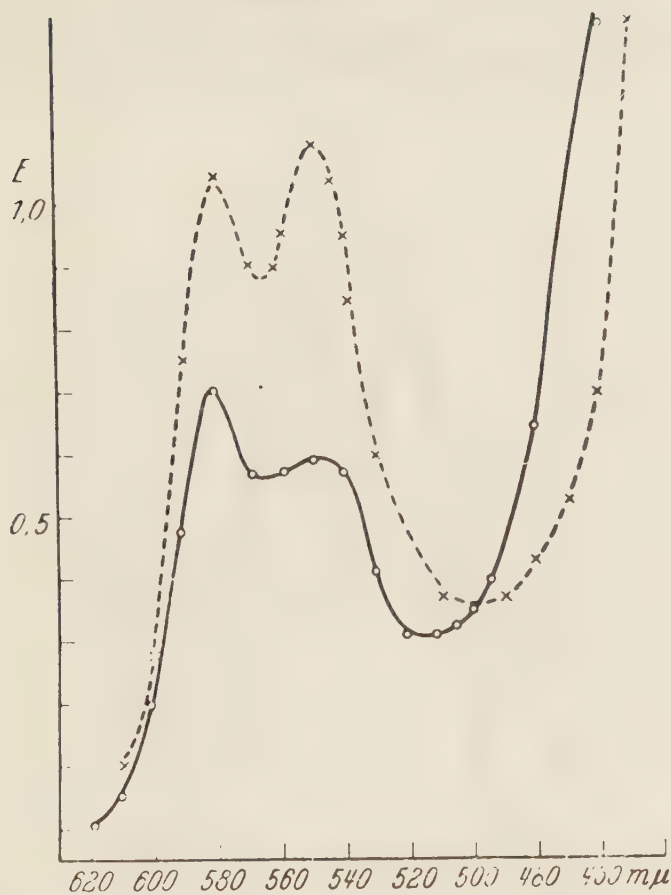
Abbildung 1



Absorptionsspektrum des alkalischen Hämatins
(entstanden aus Hämoglobininlösung nach Zusatz
von Zephirol) = durchgehende Linie

Absorptionsspektrum des Hämochromogens nach
erfolgter Reduktion der Zephirol-Hämoglobininlö-
sung durch Natriumdithionit (gestrichelte Linie)

Abbildung 2



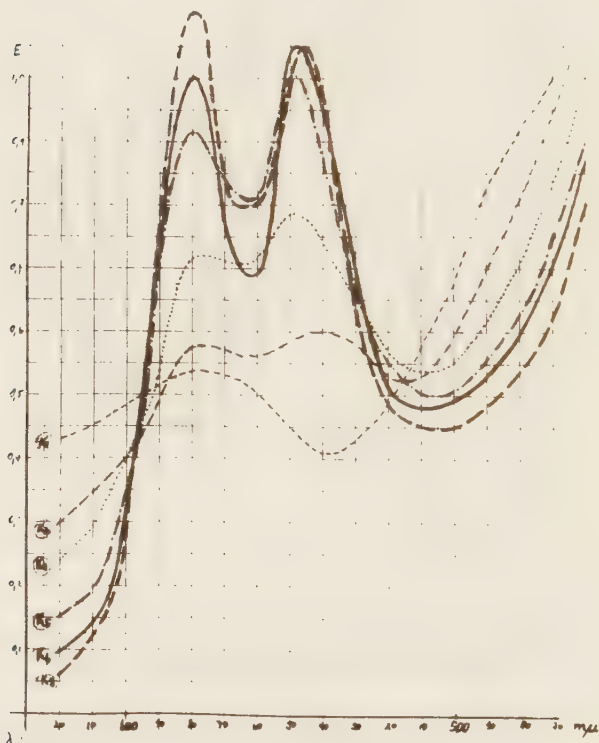
Absorptionsspektrum einer Hb-Co-Lösung nach
Zusatz von Zephirol (durchgehende Linie)

Absorptionsspektrum einer Hb-Co-Lösung nach
Zusatz von Zephirol und Natriumdithionit
(gestrichelte Linie)

In Abb. 3 ist das spektrale Verhalten einer 50%igen CO-Hb-Lösung bei variierenden Riseptinverdünnungen dargestellt.

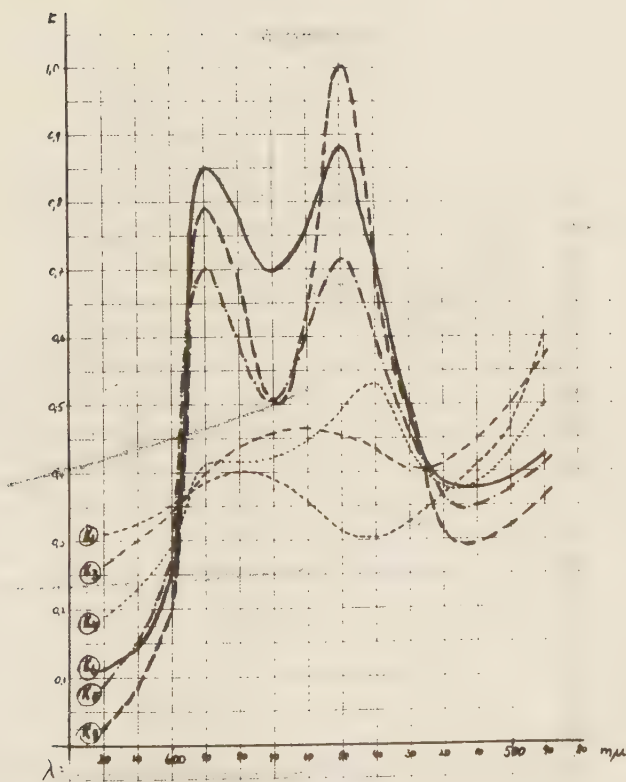
Abb. 4 zeigt die Absorptionskurven einer HbO_2 -Lösung in analogen Riseptinverdünnungen (vgl. Abb. 3 und 4).

Abbildung 3



Absorptionskurven von 50%igem COHb in Riseptinverdünnungen von 1:16 (K_1), 1:64 (K_3), 1:128 (K_4), 1:256 (K_5), 1:516 (K_6), 1:2048 (K_8) bei Zimmertemperatur.

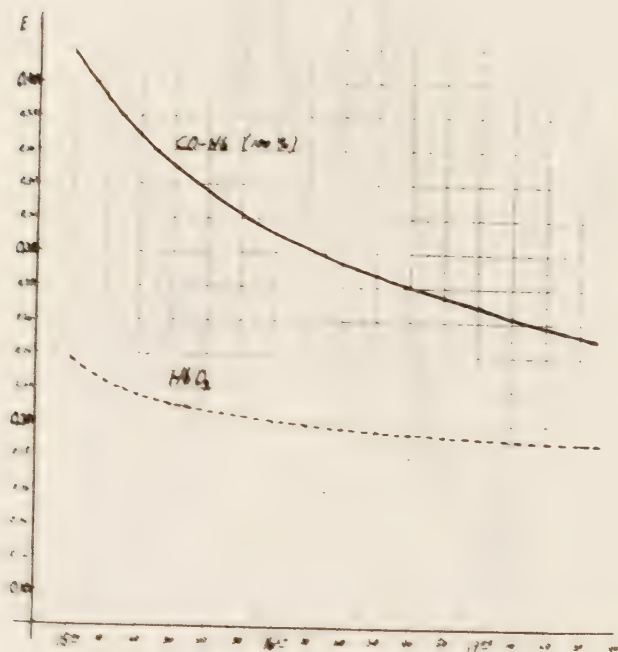
Abbildung 4



Absorptionskurven von HbO_2 in Risetinverdün-
 nungen von 1:16 (K_1), 1:64 (K_2), 1:128 (K_3),
 1:256 (K_4), 1:516 (K_5), 1:2048 (K_6) bei
 Zimmertemperatur.

In Abb. 5 ist das Verhalten einer 100%ig gesättigten COHb-Lösung und von HbO_2 , beide in üblicher Weise verdünnt, unter Berücksichtigung des Zeitfaktors dargestellt. Beide Messungen wurden im Röhrchen Nr. 1, das die Zephirolverdünnung von 1:16 enthält, vorgenommen.

Abbildung 5

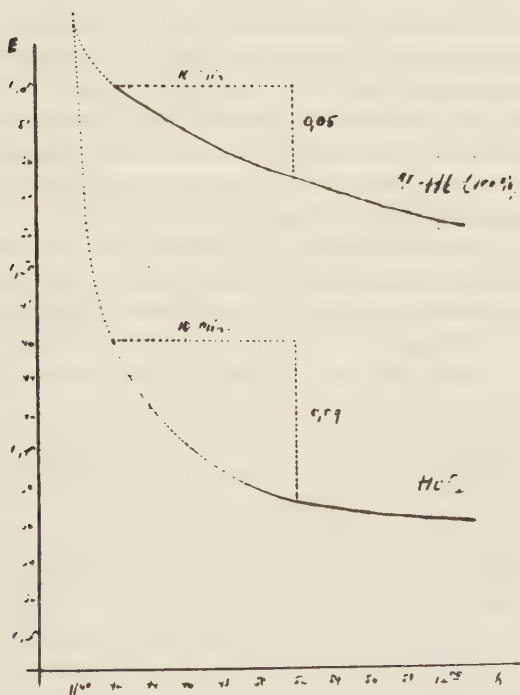


Absorptionskurven von COHb und HbO_2 bei einer Wellenlänge von 540 m μ in Abhängigkeit von der Zeit (Zeitwirkungskurve I).

Zeit in Stunden : 15.00 Uhr bis 17.40 Uhr

In Abb. 6 ist das Verhalten von 100%ig gesättigtem CO-Hb und HbO₂ dargestellt, wobei die Messung unmittelbar nach Zugabe des Blutes in die 1:16 verdünnte Zephirollösung erfolgte.

Abbildung 6



Absorptionskurven von COHb und HbO₂ bei einer Wellenlänge von 540 mμ in Abhängigkeit von der Zeit in Minuten (Zeitwirkungskurve II).
Zeit in Minuten: 11.40 Uhr bis 12.00 Uhr

DISKUSSION

Die Zephirolprobe zum Nachweis von Kohlenoxyd-Haemoglobin ist nach den bisherigen Untersuchungsergebnissen durchaus als Vorprobe geeignet. Da der Gebrauch von Hautdesinfektionsmitteln wie Zephirol und Riseptin weit verbreitet ist und vor allem in Kliniken derartige oberflächenaktive Substanzen Verwendung finden, kommt der Reaktion praktische Bedeutung zu. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß sie sehr einfach durchzuführen ist, nur geringe Materialmengen erforderlich sind und der Analyse keine Schwierigkeiten im Wege stehen. Berücksichtigt man die einschlägige Literatur, so ergeben sich zahlreiche Fragen, die im Zusammenhang mit vorliegender Arbeit zur Diskussion anregen. Die wesentlichsten Korrelationen seien im folgenden erwähnt: Hb-O_2 wird bei Alkalidenaturierung rasch braun (Hämatinbildung), Kohlenoxyd-Haemoglobin behält dagegen seinen roten Farbton bei. Dieses Phänomen, das bereits in der Mitte des vorigen Jahrhunderts seinen Niederschlag in der Literatur fand (20, 21), wurde in vorliegender Arbeit neu aufgegriffen und bestätigt. Die Gegenüberstellung der Testreihen, in denen Zephirol- bzw. Riseptinverdünnungen mit CO-haltigem und CO-freiem Blut versetzt wurden, ließ eindeutig erkennen, daß Farbunterschiede im ersteren Falle ausblieben, oder doch zumindest stark verzögert eintraten, während sie im letzteren Falle sofort in Erscheinung traten. Bei der gegebenen Untersuchungstechnik blieb die CO-Hb-Verbindung bis zu etwa 60 Minuten stabil, während die Oxyd-Hb-Verbindung sofort in ein anderes Derivat, nämlich alkalisches Hämatin oder alkalisches Hämatinoglobin, wie BETKE (22) vorschlug, umgewandelt wird. Doch stellt sicherlich auch dieses Produkt nur eine Zwischenstufe dar, da Hämatinlösungen, in Gegenwart von Stickstoff (N) zu Hämochromogenen reduziert werden. Diese Beobachtung wurde von GAMGEE (23) sowie BERTIN-SANS und DE MAITESSIER (24) beschrieben, von DILLING (25), ANSON und MIRSKY (26) bestätigt. Da sowohl Zephirol als auch Riseptin Stickstoff enthalten, dürften die letzten Endes erhaltenen Farbveränderungen auf Hämochromogen beruhen.

Es darf in diesem Zusammenhange kurz auf die interessante Tatsache hingewiesen werden, daß sich fetales Hämoglobin bei Alkalidenaturierung ungefähr analog dem CO-Hb des Erwachsenen verhält. Worauf die höhere Alkalistabilität des fetalen Blutfarbstoffes beruht, ist noch nicht geklärt. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um Strukturdifferenzen innerhalb des Hämoglobin-Moleküls, z.B. um die verschieden räumliche Anordnung von Aminogruppen und Carboxylgruppen im Molekül (27). In diesem Sinne sprechen die Beobachtungen von KÜNZER (28), daß nämlich nach Denaturierung gleicher Farbstoff-Konzentrationen mit gleicher Laugenkonzentration der resultierende p_H -Wert in Hämolysaten aus Nabelschnur und Erwachsenenblut gleich ist. In Bezug auf die zur Denaturierung erforderliche Menge in Alkali ist also fetales Hb keineswegs stabiler als Erwachsenen-Hb. BETKE folgert daraus, daß der Angriff der Lauge am Hämoglobin-Molekül verlangsamt sei. Es wäre denkbar, daß auch bei CO-Hb Strukturdifferenzen im Hb-Molekül auftreten, die für die erhöhte Alkalistabilität verantwortlich gemacht werden müssen. Die bekannte Tatsache nämlich, daß die CO-Hb-Verbindung um ein Vielfaches langsamer dissoziiert wie O_2 -Hb ist lediglich beweisend für die hohe Affinität des CO zum Hb, aber sie gibt keine Erklärung dafür ab.

Übrigens beweist auch die zweidimensionale Papierchromatographie von Hämoglobininlösungen, daß nicht etwa ein einheitlicher Eiweißkörper vorliegt, sondern, daß wie PONDER sich ausdrückt (29) verschiedene Aggregatzustände der Eiweißkörper bestehen. Auch diese Untersuchungen legen also den Gedanken nahe, daß möglicherweise mit Strukturdifferenzen im Hb-Molekül gerechnet werden muß, die im einzelnen zwar noch nicht erfaßt werden können, die aber doch für den Reaktionsablauf in Hb-Lösungen bei der Vereinigung mit anderen gasförmigen oder flüssigen Stoffen von Einfluß sein können.

Die Bedeutung, welche die Spektrophotometrie gerade für die verschiedenen Blutfarbstoffderivate besitzt, ist allgemein bekannt. Bahnbrechend waren unter anderem die Arbeiten von HÜFNER (30), HAUROWITZ (31) und HEILMEYER (32). Für die vorliegende Arbeit war von Interesse, ob aus dem Kurvenverlauf der COHb-Zephirolverdünnungen und der HbO_2 -Zephirolverdünnungen Schlußfolgerungen

auf die Umwandlungsprodukte des Hämoglobins gezogen werden können und ob der Zeitfaktor dabei eine Rolle spielt. Während die Kurven von COHb und HbO_2 in Zephirol auf Abb 1 und 2 annähernd den gleichen Verlauf zeigen, wobei COHb-Zephirol lediglich durch den größeren Extinktionswert ausgezeichnet ist, sind auf Abb. 5 und 6 deutliche Unterschiede zwischen beiden Blutfarbstofflösungen vorhanden. Im allgemeinen gleichen sich ja die HbO_2 - und COHb - Kurven weitgehend, was bereits die einfache Spektroskopie erkennen läßt. Unter den geschilderten Voraussetzungen nun erwies es sich, daß zwar die Maxima und Minima, ähnlich wie im Normalfalle übereinstimmen, daß aber der COHb-Riseptinkurve eine bedeutend größere Extinktion zukommt als der O_2Hb - Riseptinkurve. Ferner ist das Verhältnis der Lichtauslöschung in den Maximis zum Minimum bei O_2Hb viel geringer als beim COHb. Die mit CO-freiem Blut gewonnene Kurve ähnelt etwa der des alkalischen Hämatinglobins, die BETKE aus dem Hämolytat durch Zusatz von NaOH erhalten hat, während die mit CO-haltigem Blut erzielte Kurve nur unwesentlich von der reinen COHb-Kurve abweicht. Damit ist erwiesen, daß die COHb-Alkalistabilität nicht nur vorgetäuscht, sondern tatsächlich vorhanden ist, während O_2Hb , wie erwartet, eine rasche Denaturierung erfährt.

Über die letzterwähnte Denaturierung geben die Kurven in Abbildung 4 Aufschluß. Während die Kurven K/1, K/3 und K/4 einen uncharakteristischen Verlauf nehmen, wohl durch die noch zu große Riseptinkonzentration bedingt, sind die Kurven K/5, K/6 und K/8 durch charakteristische Maxima gekennzeichnet. Schon BARCROFT (33) wies darauf hin, daß zwischen dem Spektrum des reduzierten Hämins und dem Spektrum der Verbindungen des reduzierten Hämins mit N-haltigen Basen oder Eiweißkörpern, die das Spektrum des Hämochromogens geben, unterschieden werden muß. Auch HEILMEYER betont diesen Gegensatz. Er erhielt ein typisches Hämochromogenspektrum durch Versetzen einer Häminlösung mit NH_3 , dessen Maximum bei $553 \text{ m}\mu$ lag. Wie ersichtlich, ergeben sich auf Abb. 4 Maxima bei $550 \text{ m}\mu$ und $590 \text{ m}\mu$. Nach den aus der Literatur bekannten Tatsachen dürfte es sich dabei also um ein Mischspektrum aus reduziertem Hb, aus alkalischen Hämatin und aus Hämochromogen handeln.

In der zum Vergleich dienenden Abb. 3 liegen die Verhältnisse ähnlich, nur daß die Maxima und Minima nach dem kurzwelligen Ende des Spektrums hin verschoben sind. Ferner ist das Verhältnis der Lichtauslöschung in den Maximi. zum Minimum viel geringer, was besonders bei der größten Verdünnung beobachtet werden kann. Diese Veränderungen sind sicher auf das in dem Gemisch erhalten gebliebene COHb zurückzuführen. Die erwähnten Unterschiede im Kurvenverlauf zwischen Abb. 4 einerseits und Abb. 3 andererseits sind aus der Literatur beim Vergleich typischer HbO_2 - und COHb-Farbkurven hinreichend bekannt. Daß sich die Verhältnisse nicht genau rekonstruieren lassen, ist bei den völlig andersartigen Versuchsbedingungen selbstverständlich, und auf das Auftreten von Mischspektren zurückzuführen.

Z U S A M M E N F A S S U N G

In umfangreichen Versuchsreihen wurde festgestellt, daß die Desinfektionsmittel Zephirol und Riseptin in geeigneter Konzentration Farbunterschiede in Oxy-Hämoglobininlösungen hervorrufen, die auf Denaturierung des Hb-Moleküls beruhen. Da die Alkalistabilität für O_2Hb und $COHb$ beträchtlich differiert, kann auf Grund des verschiedenartigen Verhaltens beider Blutfarbstofflösungen in Verdünnungsreihen von Zephirol oder Riseptin die Anwesenheit von $COHb$ nachgewiesen werden. Bei geeigneten Versuchsbedingungen bleibt die rote Farbe des $COHb$ ca. 60 Min. lang erhalten, während CO -freies Blut infolge der augenblicklich einsetzenden Denaturierung einen braunen bis braungrünen Farbton annimmt.

Die in O_2Hb - und $COHb$ -Zephirollösungen auftretenden Farbveränderungen werden sowohl makroskopisch beschrieben als auch auf spektrophotometrischem Wege kurvenmäßig dargestellt. Der nach Vereinigung mit den Desinfektionsmittellösungen makroskopisch sichtbare Umschlag des HbO_2 von Rot nach Braun wird auf die Bildung von alkalischem Hämatin² zurückgeführt. Besonderes Interesse verdienen in diesem Zusammenhang die Tabellen 1 und 2. Die hier getroffene schematische Übersicht gestattet nämlich ohne weiteres die allmähliche Bildung von alkalischem Hämatin bei Zusatz des Desinfektionsmittels zur Oxyhämoglobininlösung zu verfolgen. Die gewonnenen Zeitwirkungskurven sind sehr charakteristisch.

Die strengen Farbunterschiede lassen sich besonders dann verfolgen, wenn die $COHb$ -Konzentration annähernd 15% im Blut erreicht hat. Je größer die Sättigung des Blutfarbstoffes mit CO um so besser werden die makroskopischen ablesbaren Befunde. Es ist also ohne weiteres möglich, diese Methode in der Klinik zur Verfolgung der Ausscheidung des Kohlenmonoxyds aus dem Blute anzuwenden. Ferner kann die "Zephirolprobe" beim CO -Nachweis im Leichenblut (Obduktionsfälle) gute Dienste leisten.

Abschließend möchte ich meinem hochverehrten Doktorvater Herrn Professor L A V E S, Direktor des Institutes für Gerichtliche Medizin der Universität München, meinen verbindlichsten Dank aussprechen, sowohl für die Überlassung eines Arbeitsplatzes in seinem Institut, als auch für die großzügige Unterstützung, die er meinen Untersuchungen zuteil werden ließ.

S U M M A R Y

Extensive study has been attached to an new and quick practical method dealing with the detection of CO-Hb content in blood using Zephirol- and Riseptin solutions as indicators.

In an series of tests it was possible to show that the disinfectant solutions ZEPHIROL "Bayer-Leverkusen" (alkylbenzyldimethyl-ammoniumchloride) resp. "RISEPTIN - Bayer" (dodecyldimethyl-3,4,dichlorbenzyl-ammoniumchloride) in suitable concentration cause an alkalized denaturation of Hb molecules with hematin formation giving an immediate rise to a change of color from red to brown in the presence of O₂Hb, whereas in the presence of CO-Hb a quite stable red color was noted which persisted for at least 60 minutes leaving thus enough time for testing spectrophotometrically any blood containing at least 15% of CO-Hb.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Handwörterbuch d. gerichtl. Med., S. 404, Berlin 1940
2. Bebiolka: Med. Diss. Heidelberg 1938
3. Haver: Med. Diss. Würzburg 1938
4. Krauland: Dtsch.Z.ger.Med. 34, 305 (1941)
5. Handwörterbuch d. gerichtl. Med., S. 404, Berlin 1940
6. Schwarzacher: Dtsch.Z.ger.Med., 12, 513 (1928)
7. May: Arch. Gewerbepath. 8, 21 (1938)
8. Heilmeyer: Med. Spektrophotometrie, Jena 1933
9. Nicloux: Bull.Soc.chim.France 13, (1947)
10. Slyke van: Quantitative clinical chemistry, Baltimore 1931
11. Schmidt: Z.klin.Med. 136, 151 (1939)
12. Fischinger: Abh. Hyg. 22, 131 (1936)
13. Fodor v.: Zit.n.Ziemke, In Abderh.Hb.biol.Arb.Meth.
Abt. IV, Bd. 1 (1938)
14. Gettler und Freimuth: Amer.J.Clin.Path. 13, H.g (1943)
15. Seifert und Schmieder: Dtsch.Z.ger.Med. 41, 435 (1952)
16. Rein: Physiologie d. Menschen, Berlin (1957)
17. Betke: Der menschl. rote Blutfarbstoff, Berlin (1954)
18. Puder: Z.Geb.z.Gyn. 145, 171 (1956)
19. Spann: Arch. Tox. 15, 196 (1955)
20. Hoppe: Virch. Arch. 11, 288 (1857)
21. Hoppe: Virch. Arch. 13, 104 (1858)
22. Betke: wie 17

23. Gamgee: Z.f.Biol. N.F. 16 (1896)
24. Bertin-Sans, de Moitessier: Compt.Rend. de l'Ac des Sc.
Paris, 116, 591 (1893)
25. Dilling: Atlas d. Krystallformen u. Absorptionsbänder d.
Hämochromogene 1910
26. Anson und Mirsky: J.of Physiol. 60, 50 (1925)
27. Waldschmidt-Leitz: Chemie d. Eiweißkörper, Stuttgart,
V.Enke 1950
28. Künzer: Z.Kinderheilk. 73, 265 (1953)
29. Ponder: Rev. d. Hématol. 7, 311 (1952)
30. Hüfner: Angelmanns Arch. f. Anat. u. Physiol.,
Physiol. Abtl. 1900, S. 39
31. Haurowitz: Z.physiol. Chem., 232, 125 (1935)
32. Heilmeyer: Med. Spektrophotometrie, G.Fischer, Jena 1933
33. Barcroft: D. Atmungsfunktion d. Blutes, 2. T. Berlin 1929
34. Laves: Dtsch. Z. ger. Med. 45, 532 (1956)
35. Lilienthal: Pharm. Rev. 2, 326 (1950)
36. Schwarzacher: Wien. klin. Wschr. 64, 685 (1952)
37. Künzer: Klin. Wschr. 34, 918 (1956)
38. Künzer: Klin. Wschr. 35, 940 (1957)
39. Fischer: Am. J.clin. Pathol. 27 (1957)
40. Lehmann u.a.: Bioch. J. 59 (IV) 1955
41. Klendshoj u.a.: J.Biol.Chem. 183, 297-303 (1950)
42. Slyke van u.a.: J.Biol. Chem. 166, 121-148 (1946)

C U R R I C U L U M V I T A E

Ich wurde am 16. Oktober 1928 in Starogard in Polen geboren. Die Gymnasialzeit beendete ich am 10. Dezember 1946 mit dem Abitur des Polnischen Humanistischen Gymnasiums in Kiel.

Von 1947 - 1949 studierte ich 5 Semester Medizin (Vorklinik) an der Universität Kiel. Von 1950 - 1953 widmete ich mich dem Mikrobiologiestudium an der University of California in Los Angeles (USA). Diplom 1953.

Nach 1 semestrigem Studiumaufenthalt an der Universität Zürich setzte ich 1955 das Klinische Studium an der Universität München fort. Winter 1958 bestand ich erfolgreich nach insgesamt 12 medizinischen Semestern das ärztliche Staatsexamen.

